항우울제에 의한
TRPC6 채널의 조절

연세대학교 대학원
의 학 과
최 영 훈

항우울제에 의한
TRPC6 채널의 조절

지도 최 종 환 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2010년 7월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

최 영 훈

최영훈의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2010년 7월 일

감사의 글

불학무술한 저에게 학업을 이어가도록 독려해 주시며, 하나의 논문이 나오도록 큰 도움을 주신 많은 분들께 진심으로 감사를 드립니다.

본 논문이 탈고를 마치기까지 항상 따스한 격려와 지도를 해 주신 최종환 교수님, 연구의 큰 방향과 틀을 잡아주고 지도를 해주신 공인덕 교수님, 정신과 전문의가 되기 위한 고단한 4년의 수련기간 동안 저를 이끌어주신 박기창 교수님, 약물에 대한 저의 미흡했던 지식으로도 그에 대한 연구를 마칠 수 있도록 애써 주신 고창만 교수님, 번뜩이는 기지와 영감으로 실험에 금석 같은 조언을 해 주신 예병일 교수님께 감사를 드립니다.

그리고 본 연구의 실험을 위해 전력하면서도, 그 밖의 제반업무들까지 자신의 일처럼 나서서 애써 주신 생리학 교실 장재승 조교님께도 감사를 드립니다.

부족하고 부족한 저를 위해 평생 고생만 하시다가 박사과정 논문의 탈고를 미처 보지 못하고 작고하신 저의 어머니께 이 졸저를 석별의 눈물과 함께 바칩니다.

또한 부족한 저를 위하여 어머니 대신 늘 옆에서 격려와 내조를 해온 사랑스럽고도 고마운 아내와 저의 삶의 원동력이 되어주는 사랑하는 두 아이 상수, 지오와 함께 이 작은 결실의 기쁨을 나누고 싶습니다.

2010 년 7 월

저자 씀

차 례

그림차례 ····· ii
표차례 ····· iii
국문요약 ····· iv

제1장. 서론 ····· 1

제2장. 재료 및 방법 ····· 8
2.1. 실험 세포 ····· 8
2.1.1. 세포 배양 ····· 8
2.1.2. Transfection ····· 8
2.2. 실험 용액 및 약물 ····· 9
2.2.1. 실험 용액 ····· 8
2.2.2. 약물 ····· 8
2.3. 세포 내 칼슘 이온 농도 측정 ····· 10
2.4. 전기생리학적 실험 ····· 11
2.5. 자료 분석 ····· 12

제3장. 결과 ····· 19

제4장. 고찰 ····· 30

제5장. 결론 ····· 33

참고문헌 ····· 34
영문초록 ····· 42

그 림 차 례

그림 1. Flag tagged human TRPC6에 사용된 p3xFlag-CMV-7.1 vector ····· 13
그림 2. YFP tagged STIM1에 사용된 pcDNA3.1(+) vector ····· 14
그림 3. HA tagged M3R에 사용된 pcDNA3 vector ····· 15
그림 4. Flag tagged canonical transient receptor potenetial 6 (TRPC6), yellow fluorescence protein tagged stromal interacting molecule 1(STIM1)과 hemagglutinin tagged human muscarinic acetylcholine receptor type 3 (hM3R) plasmid DNA가 cotransfection 된 HEK293 세포들의 광학현미경적 소견 ····· 16
그림 5. 세포 내 칼슘 이온 농도 측정을 위한 형광 이미지 장치(fluorescence imaging system)의 모식도 ····· 17
그림 6. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 모식도 ····· 18
그림 7. CCh, OAG 및GTPγ로 유발된 TRPC6 이온채널 전류에 대한 fluoxetine 억제 효과 ····· 20
그림 8. 아세틸콜린 수용체(Muscarinic receptor 3)에 의한 세포 내 칼슘이온 농도 변화 ····· 21
그림 9. 막 전압에 따른 TRPC6 단일 이온채널의 전류흐름 ····· 22
그림 10. TRPC6이온채널과 함께 co-transfection된 아세틸콜린 수용체(M3)에 대한 fluoxetine의 영향 ····· 23
그림 11. 시간에 따른 TRPC6 활성의 내향성 전류 변화양상 ····· 24
그림 12. Fluoxetine (SSRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향 ····· 25
그림 13. Trazodone (SRI) 가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기

에 미치는 영향 ····· 26
그림 14. Venlafaxine (SNRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향 ····· 27
그림 15. Bupropion (NDRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향 ····· 28
그림 16. Amitriptyline (TCA)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향 ····· 29

표 차 례

표 1. 우울증의 치료에 이용되는 약물 ····· 7

국 문 요 약

항우울제에 의한 TRPC6 채널의 조절

TRPC6 이온채널은 canonical transient receptor potential (TRPC) 계열에 속하는 칼슘 투과도를 지닌 비선택적 양이온 채널로서 G-단백질 연결 수용체 또는 tyrosine kinase 수용체의 활성을 통해 PLC-의존성 기전을 통하여 자극된다. TRPC6는 혈관 내피 성장요인조절을 통한 혈관생성, 혈관 평활근 세포의 수축 및 심장 비대에 주요한 역할을 담당하는 것으로 알려진다. 항우울제는 여러 가지 조직에 발현되어 있는 다양한 이온 채널에 억제효과를 나타내며 특히 심혈관계에 많은 부작용을 초래하는 것으로 보고된다. 이에 본 연구에서는 인체에서 유래된 TRPC6을 STIM1(stromal interaction molecule 1) 및 M3 수용체(muscarinic receptor type 3)와 함께 HEK293세포에 과 발현시킨 후 전세포 및 단일 이온채널 패치클램프 방법으로 항우울제의 영향을 알아보았다. 세포 내 GTPγs를 주입 또는 M3 무스카린 수용체 자극을 통해 TRPC6 전류를 활성화 시키고, 이에 대한 항우울제의 억제효과를 전류 전압곡선에서 확인하였다.

개열별 다양한 종류의 항우울제는 TRPC6 이온채널 활성 전류를 억제하며 농도-의존 곡선을 통한 IC_{50}의 (logM)농도는 다음과 같았다. Venlafaxine(SNRI); -4.99±0.03, fluoxetine(SSRI); -4.94±0.02, amitriptyline (TCA); -4.84±0.02, bupropion(NDRI); -4.81±0.03, trazodone(SRI); -4.58±0.01. Fluoxetine 은 GTPγs 유발성 최대 전류에 있어 농도-의존적으로 억제효과를 나타내었으나 M3 수용체

활성을 통한 TRPC6 이온 채널의 개방 특성에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

위의 실험결과로 미루어 다양한 종류의 항우울제가 TRPC6 이온채널을 직접적으로 억제하는 효과를 갖는 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : TRPC6, HEK293 세포, GTPγs, 항우울제, fluoxetine, venlafaxine, amitriptyline, bupropion, trazodone

항우울제에 의한 TRPC6 채널의 조절

<지도 **최 종 환** 교수>

연세대학교 대학원 의학과

최 영 훈

제1장 서론

정신과에서 약물이 도입된 것은 1949년 lithium의 항조증 효과가 우연히 발견된 것이 최초이며, 이어서 1952년에 마취 보조제로 합성된 chlorpromazine이 정신분열증 (schizophrenia) 치료에 사용되기 시작되면서 본격적으로 정신병 치료를 위한 약물요법이 발전하기 시작했다. 그 후 많은 종류의 향정신성약물이 개발되었고 특히 항우울제 분야에서도 많은 진전이 이루어지고 있다(B. J. Sadock and Sadock 2003). 현재까지 많은 종류의 항우울제가 개발되었으나, 작용기전으로 볼 때 크게 세 가지 신경생화학적 가설에 의거해 항우울 작용기전이 설명되어진다. 첫째, 세로토닌 (serotonin) 가설로 우울증 환자에서는 세로토닌 활성도가 저하되어 있으며 세로토닌의 대사산물인 5-hydroxyindolacetic acid의 저하는 자살과 깊은 연관성을 나타낸다. 또한 세로토닌의 전구물질인 tryptophan을 제거하거나 세로토닌의 합성을 억제하는 약물을 투여 시, 우울증의 악화를 초래할 수 있다. 결국 대부분의 항우울제가 brain에서 세로토닌 활성도를 증가시킨다는 점에서 세로토닌 저하가 우울증과의 깊은 관련성을 반증한다(Akiskal and McKinney 1975). 둘째, 도파민

(dopamine) 가설로 dopamine 활성도의 저하가 우울증과 관련이 있다는 증거들이 많이 있다. 뇌에는 네 개의 비교적 분리된 도파민 경로 (dopamine pathway)가 있다. 융기 깔대기로 (tuberoinfundibular pathway)는 시상하부 (hypothalamus)에서 뇌하수체 줄기 (pituitary stalk)로 방사되며, 프로락틴 (prolactin) 분비를 억제하는 역할을 한다. 흑질 선조계 (nigrostriatal system)는 흑색질 (substantia nigra)에서 기저핵 (basal ganglia)으로 방사되며, 불수의적 운동신경 활성을 조절한다. 중변연계 (mesolimbic pathway)는 배쪽 뒤판 (ventral tegmentum)에서 뇌의 선호 영역 (nucleus accumbens), 편도체 (amygdala), 해마 (hippocampus), 시상내배핵 (medial dorsal nucleus of thalamus) 그리고 대상회 (cingulate gyrus)로 방사되며, 감성적 표현, 학습, 강화(reinforcement) 그리고 만족 정도를 조절한다. 중간피질경로 (mesocortical pathway)는 배쪽 뒤판에서 안와전두 (orbitofrontal) & 전두엽 전부(prefrontal) 피질 영역으로 방사하며, 동기부여, 집중력, 목적에 부합하고 복합적 실행의 인지적 활동을 조절한다. 중피질과 중변연계의 도파민 활성도 감소는 우울증에서 보이는 인지적 행동 & 욕구장애와 연관된다(Stahl 2000). 셋째, 노르에피네프린(NE) 가설로 1950년대 후반, 뇌 신경에서 NE을 고갈시키는 reserpine이나 tetrabenzamine 같은 약물들이 우울증을 일으키며, NE을 분해하는 단일 아민 산화효소 (monoamine oxidase)의 억제제나 수용체에서 NE의 재흡수를 억제하는 immipramine 등 삼환계 항우울제 (TCA; tricyclic antidepressants)의 효과가 알려지면서 NE의 기능적 저하가 우울증을 일으킨다는 주장이 각광을 받게 되었다. NE의 대사물인 3-methoxy- 4-hydroxyphenylglycol(MHPG)이 뇌척수액과 소변에서 감소되어 있다는 보고도 뒤를 이었다. 하지만, 이후 이루어진 연구들에서는 주요우울장애 환자에서 NE를 주로 생성하는 청색반점 (locus coeruleus)이 오히려 활성화되어 있으며, NE 농도나 활성도가 오히려 높다는 보고들도 있는 등 초기의 비교적 단순한 가설은 지금도 인정을 받지 못하고 있다.

최근에는 뇌 부위에 따라 시간 및 자극 의존적으로 활성도가 결정되는 NE 혹은

카테콜라민 계의 조절이 적절하게 이루어지지 않아서 주요 우울장애가 발생한다는 조절이상 가설도 제시되고 있다. 비록 구체적인 이상은 명확하지 않다고 하더라도, NE계에 이상이 있다는 점은 부정할 수 없는 사실로 받아들여지고 있다(Stahl 2000). 위의 세 가지 가설에 토대로 현재 주로 사용되는 우울증 치료제는 표 1.에 제시한 바와 같다(Kent 2000). 그러나, NE, 도파민, 세로토닌과 같은 세 가지 신경전달물질로 우울증의 신경생화학적 원인을 설명할 수 있는 것은 아니다. 또한, 신경전달물질의 수용체 이상이 보다 근본적인 우울증의 원인일 것이라는 주장들도 있다. 실제로 대부분의 항우울제는 NE의 β-수용체나 5-HT 수용체의 수와 가능을 하향 조절하는 것으로 보고되고 있다(Beck 1967). 또한 세포 내 신호전달체계에 관여하는 adenylate cyclase나 phosphatidylinositol 등이 우울증에 관여한다는 보고도 있으며, 대표적인 흥분성 아미노산(amino acid)인 glutamate나 glycine이 결합하는 NMDA(N-Methyl-D-Aspartate) 수용체 과다가 우울증, 특히 인지기능 저하와 관련 있다는 결과들이 비교적 일관성 있게 보고되고 있다(B. J. Sadock and Sadock 2003). 또한 2차 전달물질과 세포 내 cascade로 우울증의 기전을 설명하려는 시도가 있는데, 신경전달물질과 시냅스 후부의 수용체의 결합이 2차 전달물질 체계에 의해 매개되는 생체막 결합과 세포 내 일련의 신호전달 과정을 일으킨다는 가설이 그것이다. 세포막의 수용체는 G-단백질을 통하여 세포 내 환경과 상호작용한다. 이어서 G-단백질은 adenylate cyclase, phospholipase C, phosphodiesterase 같은 세포 내 효소와 연결되고, 그것들은 phosphatidylinositol, calcium-calmodulin, cyclic nucleotide등의 2차 전달물질의 작용을 조절하게 된다. 2차 전달물질은 이온채널의 기능, 신경전달물질합성과 분비, protein kinase 활성을 조절한다(B. J. Sadock et al. 2009). 몇몇 연구는 우울증에서 platelet adenylate cyclase 활성, pholphoinositide hydrolysis, 세포 내 칼슘 대사, G-단백질 기능에서의 이상이 있음을 보고하고 있다. 게다가 항우울제의 시냅스에 대한 영향이 궁극적으로 유전자 활성도를 변화시켜 세포 내 일련의 반응을 통해 선택적 단일 아민 수용체의 하향

조절과 BDNF(brain-derived neurotropphic factor) 합성의 증가를 가져온다는 것이다(Delgado 2004). 그러나 약물에 대한 부작용들이 밝혀지면서, 우울증상 이외의 질환 및 그 위험인자를 동반한 환자에게는 그 복용량과 사용이 제한된다. 특히 심실 부정맥, 기립성 저혈압 유발, 심근 수축력 및 심박동수의 억제와 같은 심혈관계 부작용에 대한 연구가 많이 진행되어왔다(Amsterdam et al. 1980; Biggs et al. 1977; Glassman et al. 1979).

항우울제의 심혈관계에 대한 유형별 부작용을 살펴보면 다음과 같다. 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 (SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors)는 혈소판(platelet)을 포함한 신체 내 세로토닌 체계에 영향을 준다. 증가된 혈중 세로토닌은 혈소판 응집 (platelet aggregation)을 억제하여 비정상적인 bleeding을 유발할 수 있다. 이와 관련하여 SSRI 복용이 위-장내 비정상적인 출혈과 연관성을 나타내어 혈관계에 대한 부작용이 보고된다(Dalton et al. 2003; de Abajo et al. 1999). 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제 (SNRI; serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors)는 SSRI와 마찬가지로 심전도에는 영향을 미치지 않는다. 그러나 SNRI에 속하는 venlafaxine은 농도-의존적으로 혈압을 올리는 부작용이 있는 것으로 보고된다(Bosse et al. 2008; Reeve et al. 1999). 노르에피네프린-도파민 재흡수 억제제 (NDRI; norepinephrine- dopamine reuptake inhibitors)인 bupropion은 기립성 저혈압과 심장부담 등의 부작용과 연관이 없는 반면, 세로토닌 길항성 재흡수 억제제 (SARI; serotonin 2 antagonist/reuptake inhibitor)에 속하는 trazodone은 기립성 저혈압과 현기증을 일으킬 뿐만 아니라, 심실 내 전도 장애와 심실 부정맥이 있는 환자에게 사용하였을 때 심실과민반응이 증가하는 것으로 보고된다. (Aronson and Hafez 1986; Janowsky et al. 1983; Vitullo et al. 1990). 삼환계 항우울제는 저혈압, 빈맥, 심전도 지연 등과 연관이 있다. 이러한 부작용들(side effects)은 특히 기존 심장질환자에서는 유의해야 한다(Roose et al. 1987).

혈관계에 널지 분포하는 α_1-adrenoceptor는 교감신경을 통해 혈압조절에 중추적

인 역할은 담당한다. 이러한 교감신경 수용체의 자극은 G-단백질($G_{q/11}$)-Phospholipase C β (PLCβ)와 결합을 활성화하여 phosphoinositide 으로부터 두 가지 주요대사산물인 inositol 1,4,5 triphosphoinositide (IP3) 와 diacylglycerol (DAG) 형성을 촉진한다. 그로 인해 소포체(ER; endoplasmic reticulum)내에 저장되어 있던 Ca^{2+}의 유리와 지속적인 Ca^{2+}의 유입이 일어난다(Minneman 1988). α 1-adrenoceptor에 의해 활성화된 비선택적 양이온 채널 (nonselective cation channel)은 직·간접적으로 모두 Ca^{2+} 유입에 기여하여, DAG에 의한 활성화와 2가 양이온의 선택적 이동 및 탈분극에 의한 전압-의존적 경로 (voltage-dependent pathway)를 통해 이차적인 Ca^{2+}의 유입을 일으킨다(Carl et al. 1996; Kotlikoff et al. 1999; Kuriyama et al. 1998).

이와 같은 비선택적 양이온 채널은 최근 Transient receptor potential (TRP) 채널로 제시되어진다. 본래 TRP 채널은 trp 유전자 변이로 지속적인 빛에 대한 일시적 전압 반응을 보이는 초파리의 광수용체 (photoreceptor)에서 처음 기술되었다 (Clapham 2003; Minke 1977; Montell et al. 1985). TRP 계열 이온 통로는 그 구조 및 진화적 형성과정의 차이로 TRPC, TRPV, TPRM, TRPP, TRPML, TRPN 으로 분류된다(Clapham 2003; Huang 2004; Montell et al. 2002). 모든 TRP 단백질은 동질 또는 이형 4분자체를 이루며 기하학적으로는 voltage-gated K^+, Na^+, Ca^{2+} channel; cyclic nucleotide-gated channel; hyperpolarization- activated channel등과 유사한 6개의 세포막을 가로지르는 부분 (transmembrane segment와 N-말단 및 C-말단의 세포질 꼬리 (cytoplasmic tail)의 구조를 이룬다 (Hoenderop et al. 2003; Hofmann et al. 2002; Huang 2004). TRPCs(C; canonical 또는 classical을 의미)는 모든 포유류에 존재하는 단백질로서 초파리의 phototransduction을 포함한 TRP와 유사한 구조를 이루어 명명되었으며, G-단백질 결합 수용체 (GPCRs)의 자극과 tyrosine kinase 수용체 활성을 통해 수용체 작용적 채널 (receptor-operated channel)로 널리 알려져 있다. 이들 TRPC channel

중, TRPC3, -6와 -7 단백질은 아미노산 수준에서 70~80%의 동족관계를 형성하는데 phospholipase C를 통한 phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 및 diacylglycerol (DAG) 생성물에 의해 활성화되고 Na^{+} 비해 Ca^{2+}에 상대적으로 낮은 선택도의 특성과 세포 내 Ca^{2+} 조절의 중요한 역할을 담당한다(Boulay et al. 1997; Okada et al. 1999; Zhu et al. 1996). TRPC 계열의 하나로서 폐동맥, 내피세포와 혈관 평활근에 많이 발현되어있는 TRPC6는 수용체 작용적 양이온 유입(receptor-operated cation entry)의 역할을 통해 혈관의 탄력, 기도 저항 및 심장 기능을 조절하는 것으로 제시된다(Dietrich et al. 2007; Inoue et al. 2001; Jung et al. 2002; Owsianik et al. 2006; Welsh et al. 2002). 혈관 평활근 세포(portal vein myocyte)의 경우에는 α1-부신 수용체 활성적 양이온 채널(α1-adrenoceptor-activated cation channel)로, 대동맥 평활근 세포주에서는 바소프레신 활성적 양이온 채널 (vasopressin activated cation channel)로 중요시되며 뇌혈관의 경우 압력에 따른 탈분극과 수축에 주요한 역할을 담당한다(Inoue et al. 2001; Jung et al. 2002; Welsh et al. 2002). 이러한 혈관 평활근의 비선택적 양이온 채널은 수용체 활성을 통해 양이온 유입 (cation influx)을 이끌고 voltage-gated L-type Ca2+ 채널을 동원하여 탈분극된다. 이는 대량의 Ca^{2+} 유입를 야기하여 그 결과로서 평활근 수축이 일으킨다. 더불어 TRPC6-/- 동물모델을 통해 혈압상승과 기관지 및 혈관 평활근의 효현제 유도성 수축력 증가로 심혈관계에 중요한 이온통로로 제시된다(Dietrich et al. 2005; Gudermann et al. 2004).

이상에서 살펴본 바와 같이 TRPC6 채널은 광범위한 조직 및 세포에 발현되어 그 기능에 주요한 이온 채널로 작용한다. 지금까지 항우울제는 그 항우울 효과 및 다양한 이온통로에 대한 여러 보고가 이뤄진 반면, TRPC6 채널에 대한 영향은 거의 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 TRPC6 이온 채널을 이상 발현시킨 세포를 통해 그 특이적 기능적 특성을 확인하고, 항우울제가 TRPC6 이온 채널의 조절 요인 중 하나로 관여하는지를 규명하고자 하였다.

표 1. 우울증의 치료에 이용되는 약물

Class	Drug
Tricyclic antidepressants(TCA)	Amitriptyline Clomipramine Doxepine Imipramine Desipramine Nortriptyline
Monoamine oxidase inhibitors(MAOI)	Phenelzine Isocarboxazid
Reversible inhibitor of MAO-A(RIMA)	Moclobemide
Selective serotonin reuptake inhibitors(SSRI)	Fluoxetine Gluvaxamine Paroxetine Sertraline Citalopram
Serotonin reuptake enhancer(SRE)	Tianeptine
Serotonin antagonist & reuptake inhibitor(SARI)	Nefazodone
Serotonin & norepinephrine reuptake inhibitor(SNRI)	Venlafaxine Milnacipran
Norepinephrine reuptake inhibitor(NRI)	Reboxetine
Noradrenergic & specific serotonergic antagonist(NaSSA)	Mirtazapine
Norepinephrine & dopamine reuptake inhibitor(NDRI)	Bupropion

제2장 재료 및 방법

2.1. 실험 세포

2.1.1. 세포 배양

미국 세포주 은행 (ATCC)에서 분양 받아 배양하고 있는 HEK293 (human embryonic kidney) 세포를 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)의 성장배지로 37℃ 세포배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO_2)에서 배양하였다.

2.1.2. Transfection

Flag tagged TRPC6, YFP (yellow fluorescence protein) tagged STIM1 (Stromal interacting molecule 1)과 HA (Hemagglutinin) tagged hM3R (Human muscarinic acetylcholine receptor type 3) 3가지 plasmid DNA로 FuGENE HD transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)를 사용하여 HEK293 세포에 cotransfection하였으며 이때 사용된 vector는 그림1~3과 같다. 6well 당 각각의 plasmid DNA를 0.5㎍씩 사용하여 총 plasmid DNA : transfection reagent의 비율을 1.5㎍ : 4.5㎕ (1:3)으로 하였다. 보다 효율을 높이기 위해 초기 transfection 과정에서 혈청과 항생제 없이 1㎖의 DMEM만으로 배양하고, 6시간 이후 동일양의 20% FBS, 2% P/S 이 포함된 DMEM을 첨가하여 최종 배지의 성

분을 맞췄다. 대략 36~48시간에 걸친 transfection, 분리 및 cover glass에 안정화된 세포를 실험에 사용하였다.

2.2. 실험용액 및 약물

2.2.1. 실험 용액

무스카린성 아세틸콜린 수용체 (muscarinic acetylcholine receptor)의 활성과 PLCβ에 이은 IP3R의 활성으로 ER내 저장된 칼슘유리로 세포 내 칼슘이온농도 변화를 측정하기 위해 세포 외 관류액의 조성(mM)을 135 NaCl, 5 KCl, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, 10 glucose로 하였으며, NaOH를 첨가한 후 pH가 7.4가 되도록 적정하였다. 전기생리 실험에 사용된 전극 내 용액 (internal solution)의 조성(mM)은 140 CsCl, 1 $MgCl_2$, 2 Mg-ATP, 5 EGTA, 1.5 $CaCl_2$, 10 HEPES이며, CsOH를 첨가하여 pH 7.2가 되도록 적정하였고 세포 외 관류액(external solution)의 조성(mM)은 140 NaCl 또는 140 NMDG-Cl, 1 EGTA, 10 HEPES, 20 Mannitol이며, NaOH를 첨가하여 pH 7.4가 되도록 적정하였다. 또한 TRPC6의 활성을 위해 전극 내 용액에 GTPγs (Guanosine 5′-[γ-thio]triphosphate tetralithium salt)를 첨가하여 그 농도가 200μM이 되도록 하였다.

2.2.2. 약물

실험에 사용된 항우울제는 삼환 항우울제인 amitriptyline, 선택적 세로토닌 재흡수 억제제인 fluoxetine, 비전형적(atypical) 항우울제로서 세로토닌 재흡수 억제제인 trazodone, 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제인 venlafaxine과 노르에피네프린-도파민 재흡수 억제제인 bupropion이다. 이중 amitrityline은 명인제약

(서울, 한국)으로부터, fluoxetine과 bupropion은 대웅 Lilly(서울)로부터, trazodone은 국제약품(서울)으로부터, 그리고 venlafaxine은 한국 Roche(서울)로부터 실험용으로 제공받았다. 모든 약물은 증류수에 녹여 100mM이 되게 한 뒤, 사용 전까지 -20°C의 냉동고에 보관하였다. Fura-2/AM은 Molecular Probe(Eugene, OR, USA)로부터, carbachol과 GTPγs을 비롯한 약물 및 세포배양과 관련된 모든 배지는 Sigma(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다.

2.3. 세포 내 칼슘 이온 농도 측정

세포 내 칼슘 이온 농도를 측정하기 위하여 형광측정 장치(ratio fluorescence system)와 형광 이미지 장치(fluorescence imaging system)를 이용하였다. 세포 내 칼슘 농도 측정은 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)과 이에 연결된 형광 측정장치(Ratio fluorescence system; Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하였다. 본 실험에 사용된 시스템에는 형광염료가 부하된 세포를 여기(excitation) 시키기 위한 arc lamp housing과 이를 통해 방사(emission)되어 나오는 작은 크기의 형광 신호를 증폭시킬 수 있는 photomultiplier 튜브(PMT tube), 그리고 특정 파장의 빛을 통과시킬 수 있는 필터로 구성되어 있다(그림 5). FeliX 소프트웨어(Photon Technology International Inc., Lawrenceville, NJ, USA)를 이용하여 형광 신호들의 측정 및 분석을 실시하였다. 세포 내의 특정 이온 농도를 측정하기 위해서는 그 이온과 결합하는 형광염료(fluorescence dye)를 세포 내에 부하시켜서 형광 현미경을 통해 방출되는 특정 형광의 세기를 분석하여야 한다. 이에 본 실험에서는 칼슘 이온 농도를 측정하기 위하여 칼슘의 농도를 반영하는 fura-2/AM 형광 염료를 사용하였다. 실험 방법은 36~48시간내에 cotransfection (TRPC6-Flag + STIM1-YFP + M3R-HA)된 HEK293 세포가 있는 배양접시에 fura-2/AM을 5μM 농도로 처치하여 실온에

서 빛이 차단된 37℃ 세포배양기(humidified incubator; 95% air-5% CO_2)에서 30분간 두어 세포 내로 부하시켰다. 부하가 끝나면 세포 외 남아있는 형광 염료를 제거하기 위해 세포 외 관류액으로 2회 세척(wash-out) 후 15~20분간 두었다가 현미경 위에 올려놓고 실험을 실시하였다. 이후 안정화된 세포에 약물이 포함된 관류액을 중력에 의해 1~2㎖/min 속도로 관류하는데, 이때 나타나는 형광세기의 변화를 기록 및 분석하였다. Fura-2의 형광 특성상 340nm와 380nm의 빛으로 번갈아 가며 여기(excitation) 시켰을 때 510nm로 방사(emission)되는 형광강도의 비율(F340/F380)이 세포 내 이온 농도를 반영하게 된다.

2.4. 전기생리학적 실험

전기 생리적 실험은 EPC9 (Instrutech Corp., NY, USA) 패치 클램프 증폭기(patch clamp amplifier)를 사용하여 전형적인 전세포 패치 클램프 (whole-cell patch clamp) 방법으로 측정하였다(Hamill et al. 1981). 측정 전극은 borosilicate glass capillary (외경 1.65mm, 내경 1.2mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co.)로 제작하여 사용하였다. 만들어진 전극은 Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅을 하고 microforge로 열처리하여 다듬었으며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 2~3㏁이 되는 것을 사용하였다. 세포가 붙어 있는 cover glass를 도립현미경(inverted microscope, Nikon) 위에 올려놓고, 세포 외액을 중력에 의해 1~2㎖/min 속도로 관류시켰다. 세포막 전류는 막전압 고정법(voltage-clamp method)을 사용하여 측정하였다. 막전압 고정법 기록을 위해서 세포막의 용량(capacitance)과 직렬저항(series resistance)은 80% 이상 보정하였으며, 실험 시 sampling rate은 1 ㎑, low-pass 필터는 2 ㎑ (-3dB; 8-pole Bessel filter)로 하여 기록하였다. 실험결과는 Pulse/Pulsefit(v8.50) (Heka

Elektronik, Lambrecht, Germany)를 통해 IBM 컴퓨터에 저장하여 분석하였다. 모든 실험은 실온(22~24°C)에서 시행하였으며, 본 실험에 사용된 전류 측정 장치는 그림 6에 도식적으로 나타내었다.

2.5. 자료 분석

모든 결과는 평균±표준오차(SEM)로 나타내었고, n은 실험한 세포의 수를 나타낸다. 통계적인 의의는 Student's t-검정을 실시하여, p 값이 0.05이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다. 측정된 전류의 크기는 Pulse/Pulsefit 소프트웨어(Heka Elektronik)를 이용하여 계산하였으며, 반응결과 그래프는 Prism 4.0 software(GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 구하였다. 전류의 크기는 최대크기(peak current)의 값을 이용하였고 전류크기의 변화 그래프는 Igor PRO(Wave-Metrics, Lake Oswe해, OR, USA)으로 비교하였다. 그리고 세포 내 Ca^{2+} 이온 농도 변화 값은 ORIGIN(ver 7,0) Northampton, MA, USA)으로 분석하여 비교하였다.

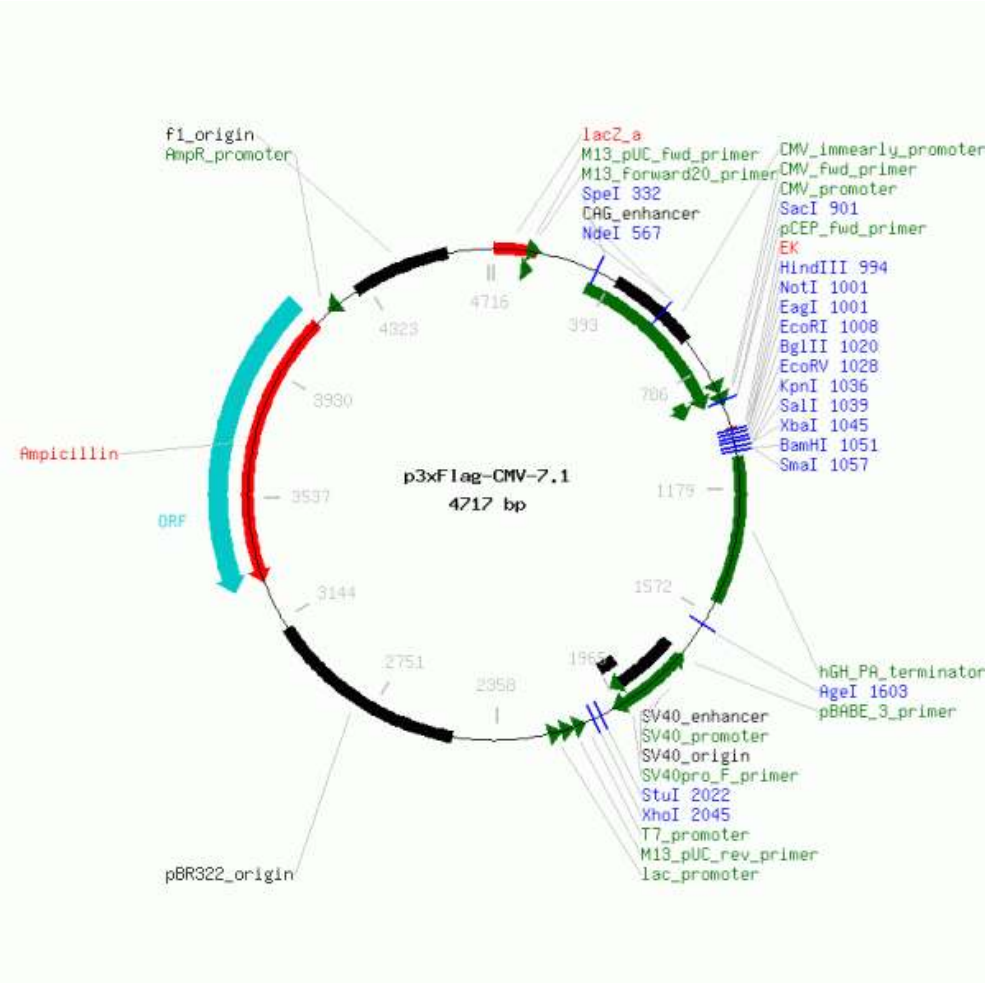


그림 1. Flag tagged human TRPC6에 사용된 p3xFlag-CMV-7.1 vector

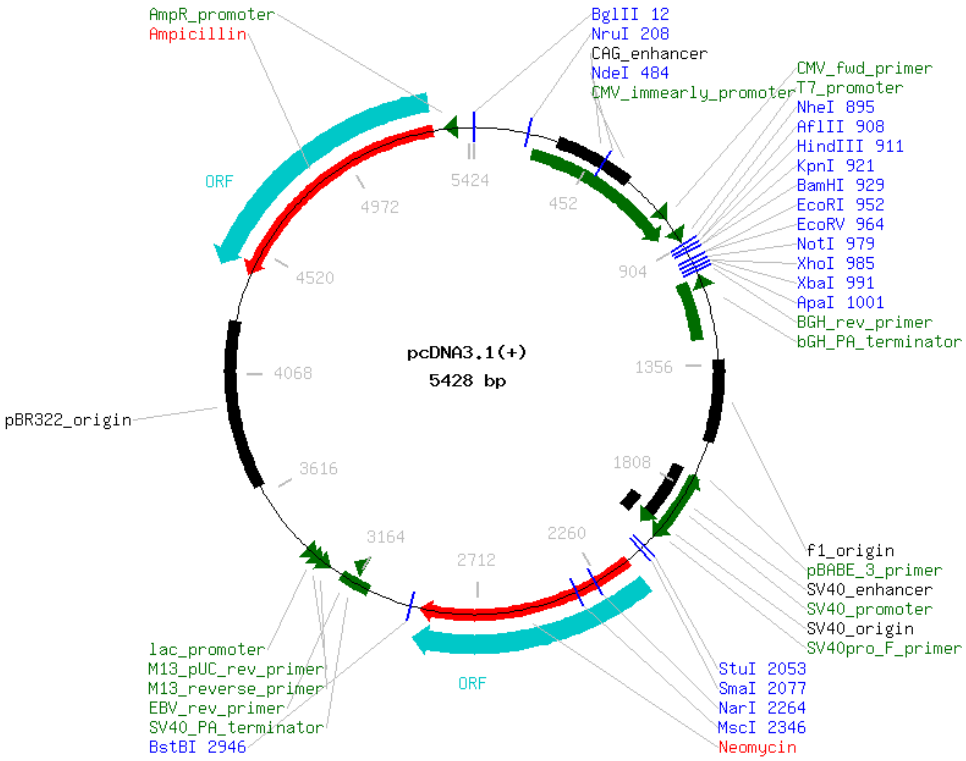


그림 2. YFP tagged STIM1에 사용된 pcDNA3.1(+) vector

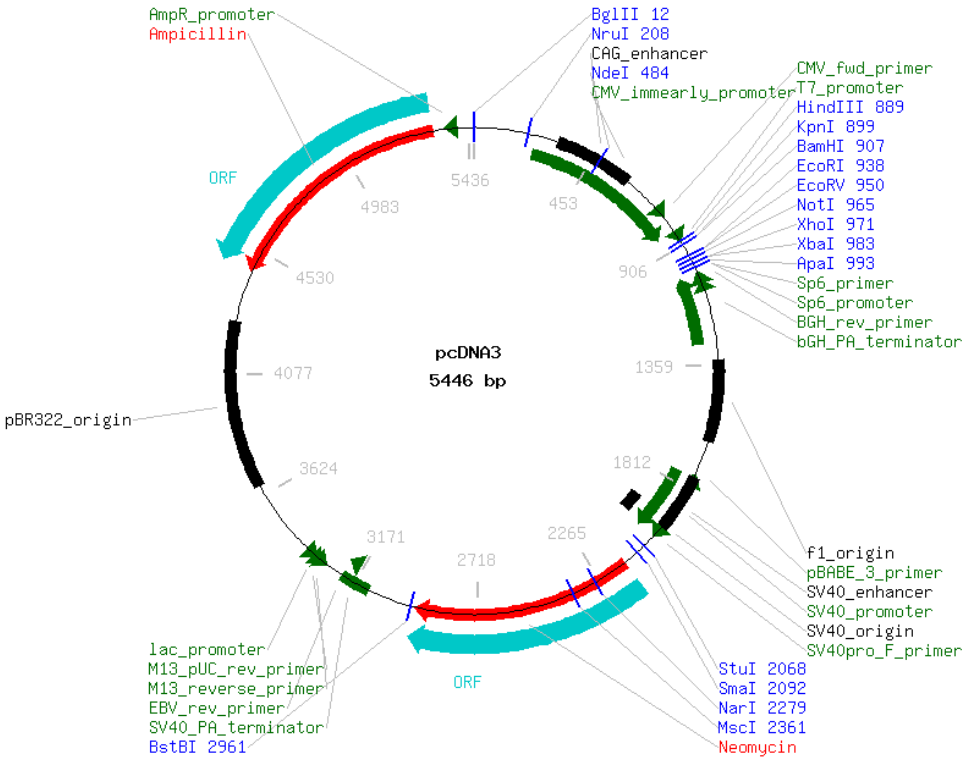


그림 3. HA tagged M3R에 사용된 pcDNA3 vector

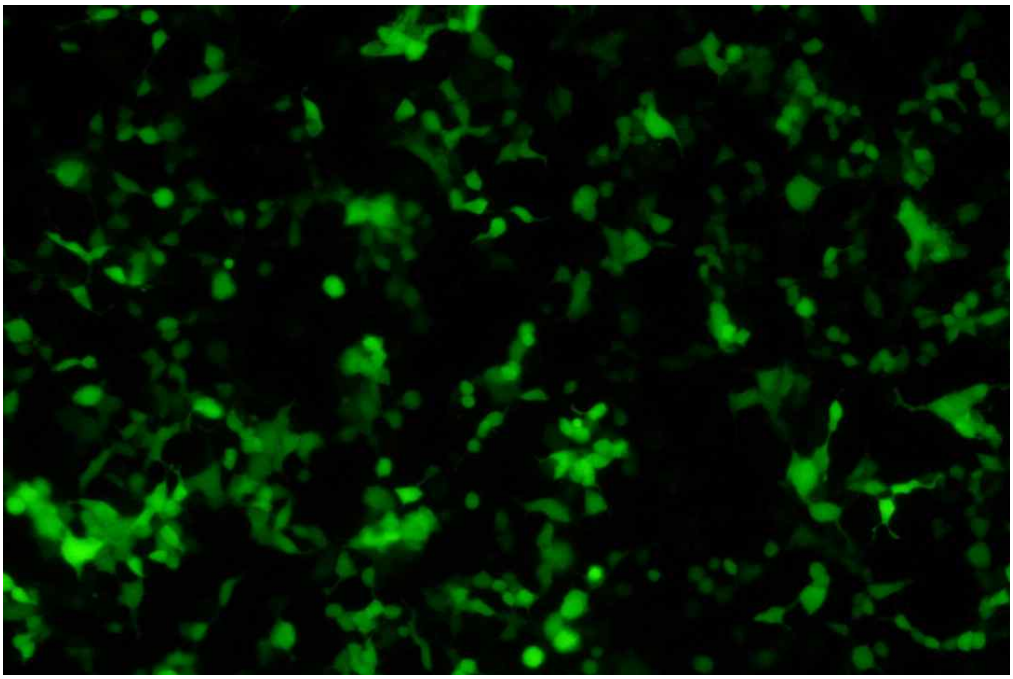


그림 4. Flag tagged canonical transient receptor potenetial 6 (TRPC6), yellow fluorescence protein tagged stromal interacting molecule 1(STIM1)과 hemagglutinin tagged human muscarinic acetylcholine receptor type 3 (hM3R) plasmid DNA가 cotransfection 된 HEK293 세포들의 광학현미경적 소견. 형광 이미지 장치 (fluorescence imaging system) 이용하여 450~490nm 파장으로 세포를 여기(excitation)시킨 후, 520nm의 파장을 선택적으로 통과할 수 있는 필터를 통해 세포에서 방사 (emission)되어지는 형광을 감지하여 transfection된 세포를 구별한다.

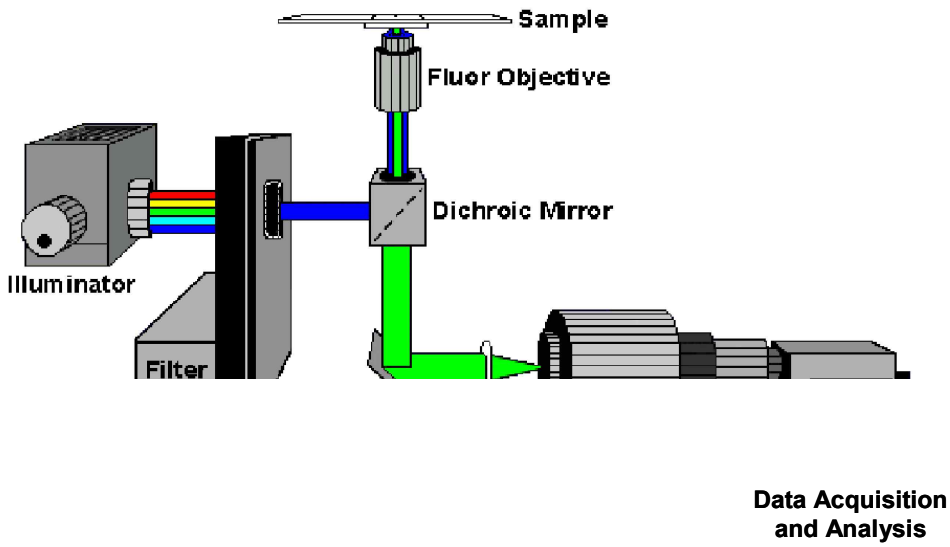


그림 5. 세포 내 칼슘 이온 농도 측정을 위한 형광 이미지 장치(fluorescence imaging system)의 모식도. Illuminator에서 발생되어 나오는 광원이 필터를 통과하여 선택적으로 488nm 파장의 빛만을 방출한 후, dichroic mirror에서 반사되어 세포를 여기(excitation)시키면 사방으로 형광이 방사(emission)된다. 그 중 530nm 파장에 해당하는 형광만이 relay lens와 영상 증배관(image intensifier)를 통과하면서 CCD 카메라에 포착되고 이를 계수화 하여 컴퓨터 하드디스크에 저장된다.

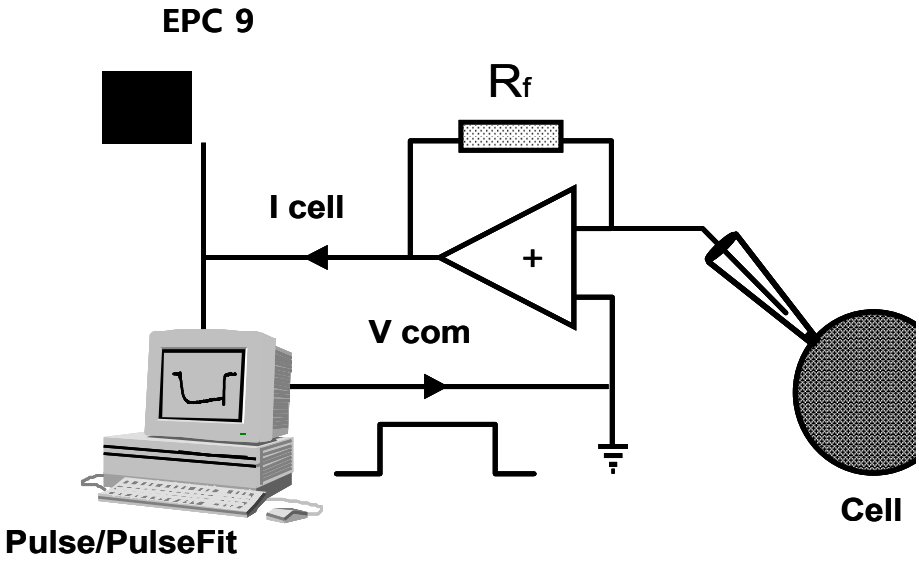


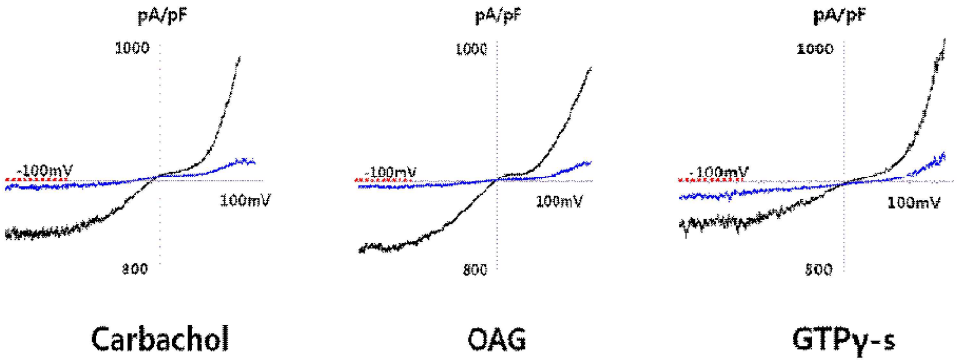
그림 6. 막전압 고정법에 의한 이온 전류 측정 장치의 모식도. 패치 클램프 전용 소프트웨어 (Pulse/Pulsefit 혹은 pClamp6)를 이용하여 만든 전압 프로토콜로 고정하고자 하는 전압(V com)을 A/D converter (EPC-9 혹은 digidata 1200)를 거쳐 아날로그 신호로 바꾸어 패치 전극(patch pipette)을 통하여 전달하고 세포막에 존재하는 이온통로의 활성 정도에 따라 변화하는 전압을 고정하기 위해 증폭기(EPC-9)를 통하여 흘려주는 전류(I cell)를 다시 디지털로 전환하여 컴퓨터에 저장한다.

제3장 결과

TRPC6가 transfection 된 HEK293세포에 전세포 패치 클램프에서 막전압을 -100mV로 고정한 후 GTPγs, CCh와 OAG 의해 내향성 전류가 나타났고 fluoxetine(100μM)에 의해 90%이상 전류의 크기가 감소하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 무스카린성 아세틸콜린 수용체인 M3R 만이 transfection 된 세포에 fura-2/AM (5 μM)을 부하한 후 형광 장치(ratio fluorescence system)를 이용하여 세포 내 칼슘농도를 측정하였을 때, 10 μM 아세틸콜린에 의해 $[Ca^{2+}]_i$ 일시적 증가가 관찰되었으며, 반복 측정 시에도 세포 내 칼슘 이온 농도는 유의한 변화 없이 재현되었다. 아세틸콜린에 의해 증가한 세포 내 칼슘 이온 농도는 세포외 fluoxetine(10 μM)에 의해 별다른 감소를 나타내지는 않았다(그림 8). Inside-out 및 on-cell 단일 이온 채널 패치 클램프 방법으로 전압에 따른 전류변화와 채널의 활성을 측정하였다. 0mV 에서 역전전압을 나타내었고 fluoxetine(10 μM)는 아세틸콜린에 의해 증가된 내향성 전류를 변화시키지 않았다(그림 9,10).

TRPC6 이온 채널활성을 통한 보다 지속적인 내향성 전류크기 증가를 위해 GTPγs유발성 이온채널 활성화 방법을 사용하였고 전세포 패치 클램프에서 막전압을 -100mV로 고정하여 최대 내향성 전류에 대한 항우울제의 영향을 살펴본 결과, 항우울제 농도에 따른 전류 감소가 나타났다. 항우울제에 의한 GTPγs유발 전류의 감소효과는 농도-반응 곡선을 통해 보았을 때 venlafaxine > fluoxetine > amitriptyline > bupropion > trazodone 순으로 나타났다(IC_{50}= -5.49±0.03 logM, -5.44±0.02 logM, -5.34±0.02 logM, -5.31±0.03 logM, -5.01±0.01 logM).

A



B

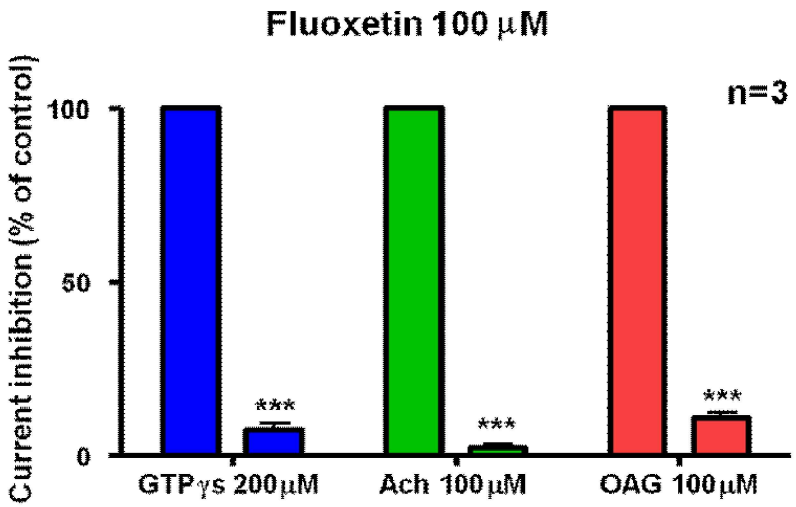


그림 7. CCh, OAG 및 GTPγ로 유발된 TRPC6 이온채널 전류에 대한 fluoxetine 억제 효과. A. CCh, OAG와 GTPγs로 유도된 TRPC6이온채널 전류는 내·외양성에서 모두 세포외액 내에 fluoxetin 존재 시 현저히 감소하였으며, 세척에 의해 회복되지 않았다. B. Fluoxetine는 최대 활성화된 TRPC6 전류크기에 통계적으로 유의한 억제 효과를 나타내었다. 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV)하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며, 실험 례수는 3례(실험은 3회 반복함). ***p<0.001

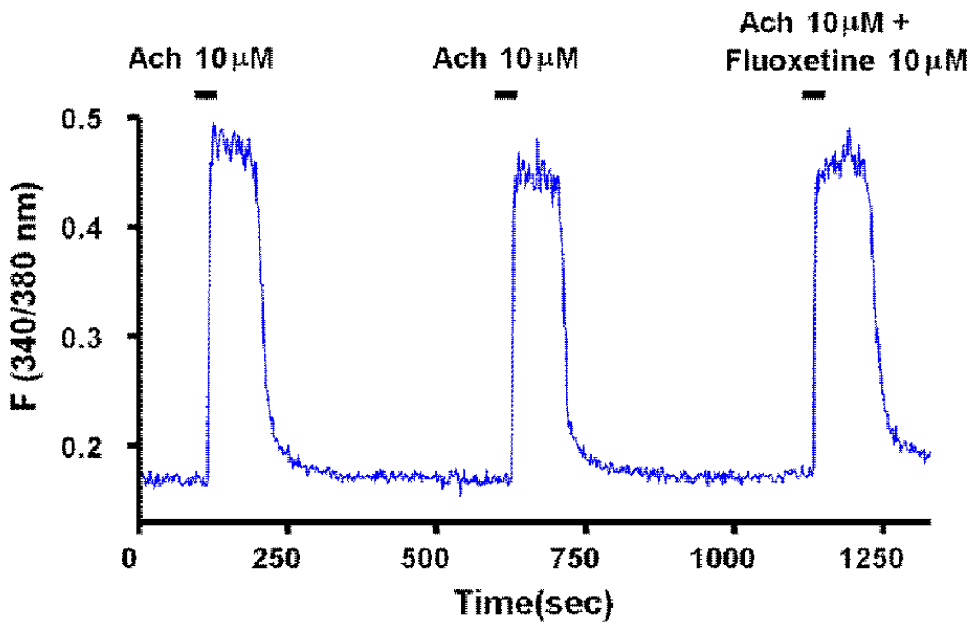


그림 8. 아세틸콜린 수용체(Muscarinic receptor 3)에 의한 세포 내 칼슘이온 농도 변화. ACh(10μM)에 의한 증가된 세포 내 칼슘이온 농도는 fluoxetine(10μM)에 의해 영향을 받지 않았다. 세포 내 칼슘이온 농도 측정은 칼슘 측정 염료인 fura-2/AM을 부하시켜 형광측정 장치로 기록하였다.

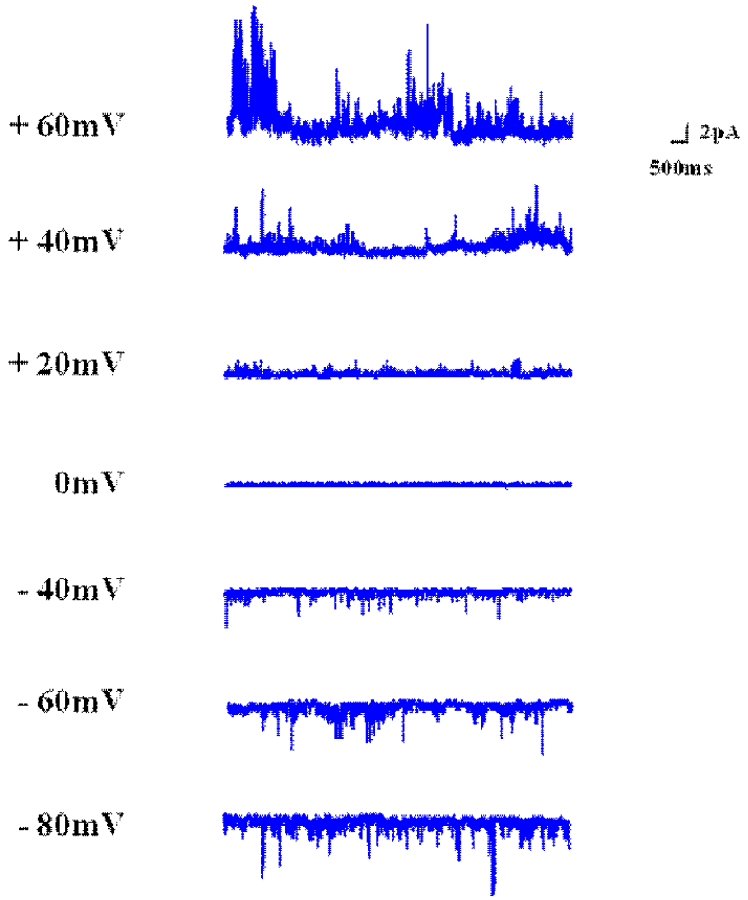


그림 9. 막 전압에 따른 TRPC6 단일 이온채널의 전류흐름. 0mV에서 전류 흐름이 가역적으로 변화하였다. 이는 본 실험에서 charge carrier로 사용된 Na^+이동을 확인함으로 voltage-dependent 특성을 가진 TRPC6의 존재를 확인하였다. 막 전압에 따른 단일 이온채널의 개방 특성은 inside-out 단일 채널 패치 클램프 방법으로 측정하였다.

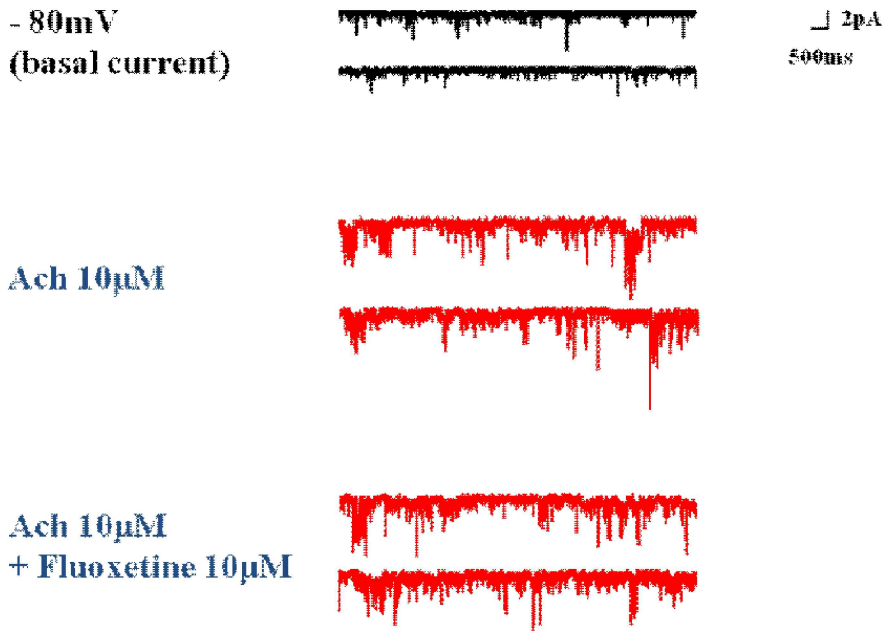


그림 10. TRPC6이온채널과 함께 co-transfection된 아세틸콜린 수용체(M3)에 대한 fluoxetine의 영향. 아세틸콜린 수용체 자극을 통한 TRPC6 이온채널 활성 도모 후 세포 외액에 fluoxetine을 처치하였지만, 이온채널에는 변화를 주지 않았다. TRPC6 이온채널 활성을 이끄는 아세틸콜린 수용체에 대한 fluoxetine의 영향을 알아보기 위해서 on-cell 단일 채널 패치 클램프 방법을 사용하였다.

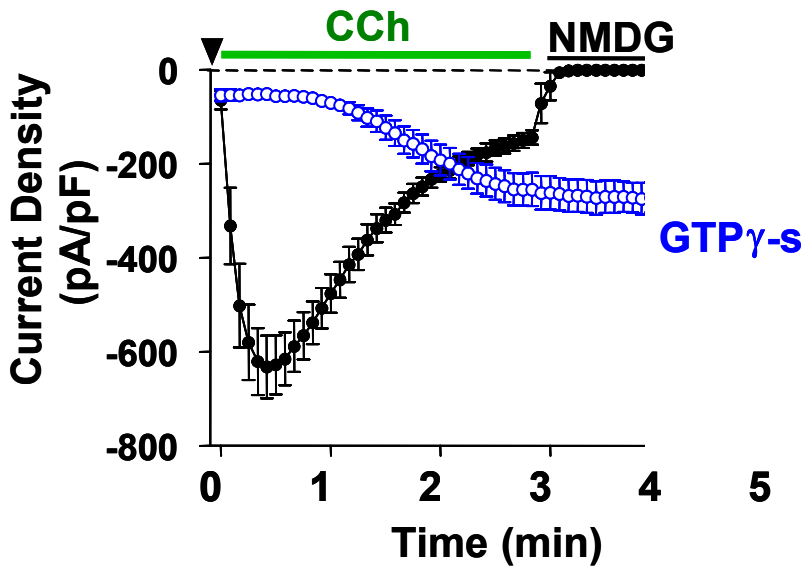


그림 11. 시간에 따른 TRPC6 활성의 내향성 전류 변화양상. 아세틸콜린 수용체 자극을 통한 이온채널의 활성은 1분 이내에 최대 전류를 나타내고 급격한 비활성화를 나타내는 반면, GTPγs의 경우는 그 최대 전류가 전자에 비해 낮고 시간에 따른 비활성화의 정도가 완만하다. 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV)하에서 측정하였다.

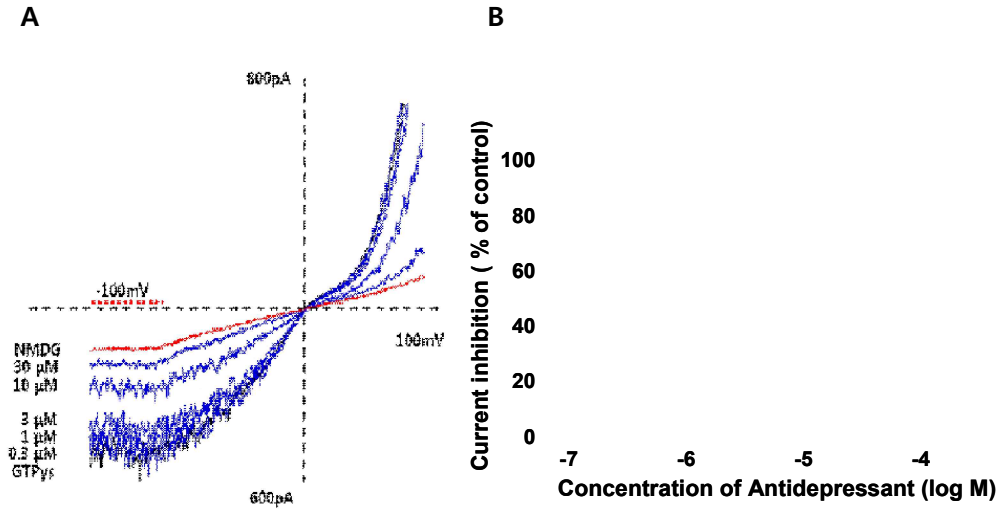


그림 12. Fluoxetine (SSRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향. 세포 내 GTPγs (200μM) 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류는 선택적 세로토닌 재흡수 억제제인(SSRI) fluoxetine (0.3~30μM)를 처치하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(IC_{50} 3.61±0.12μM). 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV) 하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험 례수는 각각 농도당 6례.

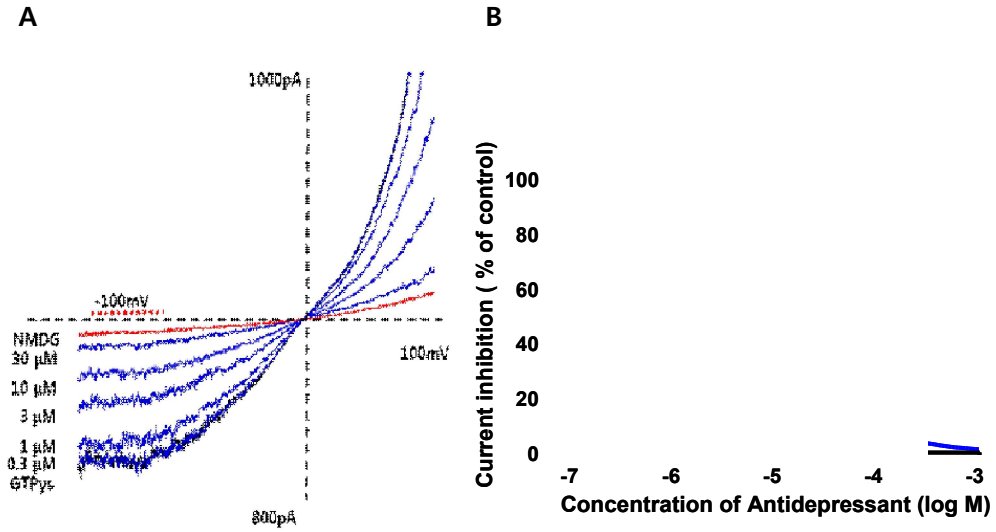


그림 13. Trazodone (SRI) 가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향. 세포 내 GTPγs (200μM) 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류는 세로토닌 재흡수 억제제인(SRI) trazodone (0.3~30μM)를 처치하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(IC_{50} 8.39±0.19μM). 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV) 하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험 례수는 각각 농도당 5례.

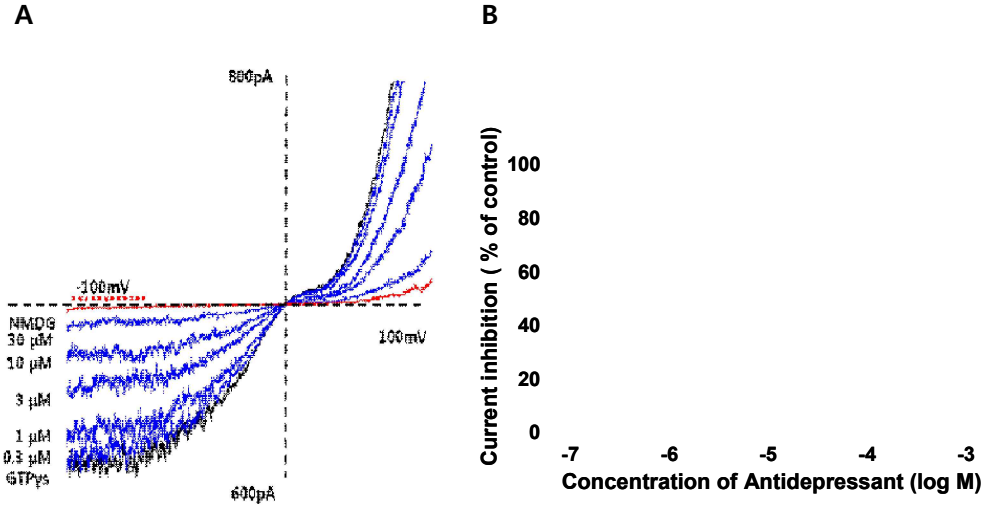


그림 14. Venlafaxine (SNRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향. 세포 내 GTPγs (200μM) 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류는 선택적 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제인(SNRI) venlafaxine (0.3~30μM)를 처치하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(IC_{50} 3.23±0.21μM). 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV) 하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험례수는 각각 농도당 6례.

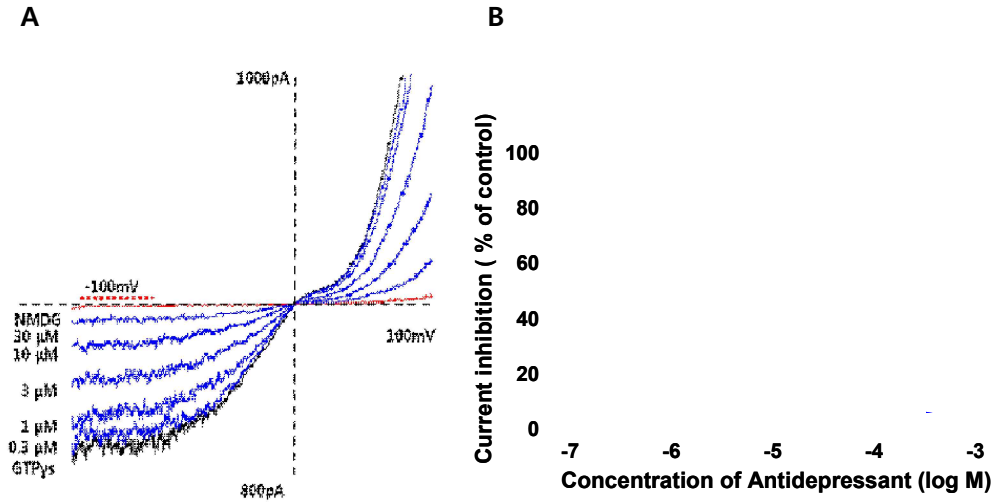


그림 15. Bupropion (NDRI)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향. 세포 내 GTPγs (200μM) 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류는 노르에피네프린-dopamin재흡수 억제제인(NDRI) bupropion (0.3~30μM)를 처치하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(IC_{50} 4.95±0.26μM). 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV) 하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험 례수는 각각 농도당 6례.

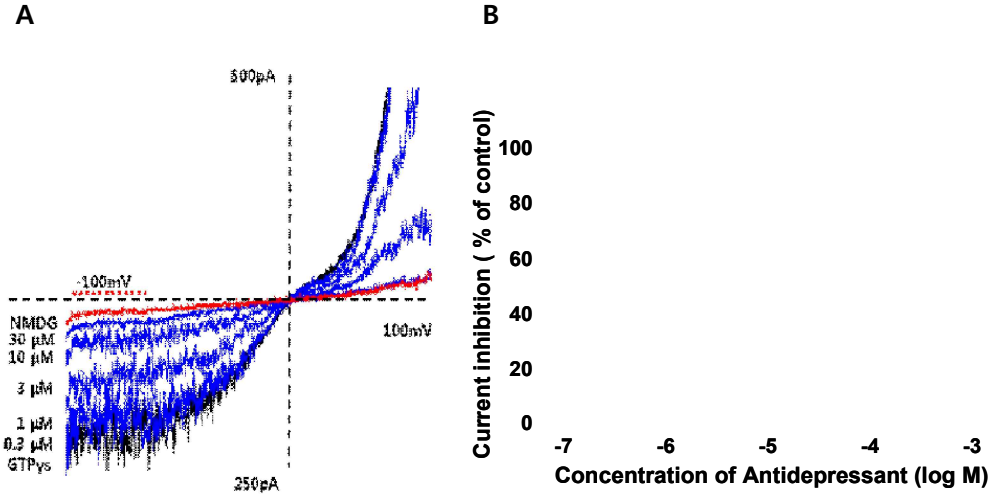


그림 16. Amitriptyline (TCA)가 GTPγs 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류 크기에 미치는 영향. 세포 내 GTPγs (200μM) 투여에 의해 유발된 TRPC6 전류는 삼환계 항우울제인(TCA) amitriptyline (0.3~30μM)를 처치하였을 때 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(IC_{50} 4.62±0.13μM). 전류기록은 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 전압 고정법(HP=-100mV) 하에서 측정하였다. 데이터는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험 례수는 각각 농도당 6례.

제4장 고 찰

항우울제들은 우울증 치료에는 매우 효과적임에도 불구하고, 치료 목적이외에 나타나는 심혈관계 부작용의 위험 때문에 그 사용에 있어 많은 제약이 따른다 (Amsterdam et al. 1980; Biggs et al. 1977; Glassman et al. 1979). 비전형적 항우울제, monoamine oxidase 억제제 및 선택적 세로토닌 재흡수 억제제 등이 지속적으로 개발되어 우울증 치료에 사용되고 있으나, 이들이 심혈관계의 주요기능을 담당하는 이온채널에 미치는 부작용에 관한 실험적 결과들은 아직 잘 알려지지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 여러 항우울제들이 심혈관계 및 신장 등에서 그 목적 세포의 기능에 주요한 TRPC6 이온채널에 미치는 영향을 서로 비교하였으며, 이러한 효과들의 기전 추구의 일환으로 이온전류의 변화를 관찰하였다.

세포 외액에 항우울제를 포함시킬 경우, Na+ 전류의 크기는 첨가한 항우울제의 농도에 비례하여 감소되었다. 그러나 아세틸콜린 자극에 의한 M3 수용체 활성으로 증가된 세포 내 Ca^{2+} 에는 항우울제가 영향을 주지 않았으며 단일 이온채널에서의 전류변화 측정결과 역시 같은 결과를 나타내었다. 이러한 점으로 볼 때 항우울제의 Na^{+} 전류 억제효과는 수용체를 경유하지 않고 직접적으로 TRPC6 이온채널에 작용하여 Na^{+} 전도(conductance)를 감소시켜 나타난 결과로 생각된다. TRPC6는 voltage-gated 칼슘 채널과 기능적인 협력관계를 이루는데 TRPC6를 통한 세포 내 Na^{+} 유입은 세포막의 탈분극을 유발하여 voltage-gated 칼슘채널의 활성과 잇따르는 Ca^{2+}유입을 이끈다(Estacion et al. 2006; Gudermann et al. 2004).

혈관 평활근 세포에 있어서 중요한 역할을 하는 TRPC6는 α_1-adrenoceptor -activated non-selective cation channel로 제시되는 가운데, 대동맥 평활근 세포주인 A7r5세포에서는 vasopressin-, 5-hydroxytriptamine (5-HT)-, platelet derived growth factor (PDGF)-activated cation channel로 보고된다(Inoue et al.

2001; Jung et al. 2002). 또한 혈관 내에서 Bayliss effect로 알려진 소동맥의 압력-유발 탈분극 및 수축에 결정적인 역할을 하는 것으로 제시된다(Welsh et al. 2002). 혈류저항에 대한 동맥의 근원성 수축은 TRPC6 이온채널에 의해세포막의 탈분극이 조절되고 뒤이은 voltage-gated 칼슘채널을 통한 칼슘유입의 결과로 일어난다. 따라서 항우울제에 의해 TRPC6이온채널 억제 효과가 나타난다면, 혈관 평활근의 탈분극 및 수축에 영향을 미치게 되어 약물에 대한 부작용을 초래할 것으로 사료된다.

TRPC6 이온채널은 양이온의 유입을 통해 평활근의 수축력이 증가에 깊이 관여하며, 이러한 TRPC6 기능의 상실은 혈관 평활근 긴장도의 감소를 초래하여 저혈압과 같은 상황을 유발하게 된다(Dietrich et al. 2005; Dietrich et al. 2007). 실제로 삼환계 항우울제 치료 중 가장 흔한 심혈관계 부작용은 기립성 저혈압이라 보고되며(Glassman and Preud'homme 1993), 이는 주로 α1-교감신경 수용체 차단효과에 의해서 나타나는 것으로 보인다(Tang and Seeman 1980). 자세변동에 따른 혈압변화와 그 보상작용으로 반사적 교감신경의 자극을 통해 혈관수축효과가 일어나게 되는데, 이때 삼환계 항우울제 투여가 이러한 작용을 억제하는 부작용을 야기한다. 본 실험 결과로 볼 때, 항우울제들이 α1-교감신경 수용체와 무스카린성 수용체에 대한 강력한 차단효과(Tang and Seeman 1980)와는 별도의 기전으로 직접 TRPC6 이온채널 억제효과를 나타내어 심혈관계의 부작용을 초래할 것으로 사료된다.

선택적 세로토닌 재흡수 억제제는 여러 임상 사례 연구들을 통해 비정상적인 장내출혈의 부작용이 보고된다. 혈소판에서의 세로토닌 분비는 응집에 중요한 요인으로 알려진다(Meijer et al. 2004). 혈소판은 그 자체적인 세로토닌을 합성이 불가능하며 세로토닌 운반체를 통한 순환에 의해 보충되는데, 장기간의 SSRI복용은 이러한 세로토닌 운반체를 억제하고 혈소판 내부의 세로토닌 수준을 낮춤으로 응집반응 저하의 결과로 출혈을 야기한다(Li et al. 1997; Skop and Brown 1996).

또한 혈소판의 세포막에는 상당한 수준의 TRPC6 이온채널이 발현되어 있다(Hassock et al. 2002). Na^+/Ca^{2+} exchanger의 세포막 발현 수준에 따른 Na^+유입이 혈소판 활성과 깊은 연관성을 나타내며(El-Daher et al. 2000; Rengasamy et al. 1987; Roberts et al. 2004), TRPC6가 Na^+ 유입을 이끌어 Na^+/Ca^{2+} exchanger를 활성화하여 Ca^{2+} 유입을 주도하는 것으로 제시된다(Authi 2007). 따라서 선택적 세로토닌 재흡수 억제제는 세로토닌 운반체 억제뿐 아니라 혈소판 세포막에 존재하는 TRPC6 이온채널의 억제효과로 혈소판의 활성 저하 또는 응집의 부작용을 초래할 수 있을 것으로 생각된다.

TRPC6 이온채널의 전류 차단작용은 선택적 세로토닌 재흡수 억제제인 fluoxetine과 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제인 venlafaxine의 효력이 다른 계열의 항우울제들 보다 다소 강력하였다. 일반적으로 선택적 세로토닌 재흡수 억제제들은 심혈관계 부작용이 적은 것으로 알려져, 우울증에 대한 1차 치료제로 근래 사용이 크게 증가하고 있다. 하지만 Ca^{2+} 및 K^+ 전류 차단작용을 통한 혈관 수축 억제 및 심기능 저하정도가 다른 계열의 항우울제들과 유사하게 나타난다(Park et al. 1999). 따라서 이후 선택적 세로토닌 재흡수 억제제의 부작용뿐만 아니라 계열별 항우울제에 대한 보다 자세한 연구가 진행되어야만 그 안정성 여부를 확신할 수 있으리라 생각된다. 본 실험을 통해 살펴본 계열별 항우울제들은 비선택적 양이온 채널로 제시되는 TRPC6의 전류억제 효과를 나타내며, 그 중 특히 선택적 세로토닌재흡수와 세로토닌-노르에피네프린 재흡수 억제제의 경우 그 억제효과가 더욱 강력함을 알 수 있었다. 따라서 심혈관계 및 신장 기능이상이 있어 부작용의 위험이 높은 환자일 경우 보다 주의를 기울어야 할 것이다. 아울러 고위험군에 대한 적절한 처방을 위해 항우울제들의 심혈관계 부작용에 관한 더욱 광범위한 연구가 진행되어야 하며, 부작용에 대한 기전이 명확히 규명된다며 이를 토대로 항우울제에 대한 심혈관계 질환의 치료목적으로서의 접근 가능성도 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

제5장 결 론

본 연구는 HEK293 세포 내에 과 발현된 TRPC6 이온채널 활성화에 따른 항우울제의 영향을 관찰하여 다음의 결과를 얻었다.

1. CCh, OAG, GTPγs에 의해 TRPC6 이온 전류가 활성화 되었으며, 이때 발생하는 내향성 전류는 NMDG 대치를 통해 선택적으로 억제되었다.
2. GTPγs의 투여는 항우울제에 의한 TRPC6 이온전류의 억제효과를 측정하는 효과적 방법이었다.
3. 항우울제의 투여가 아세틸콜린 자극에 의한 M3 수용체 활성화에는 직접적인 영향을 주지 않았다.
4. 각 항우울제의 IC_{50}를 비교하였더니 venlafaxine (3.23±0.21μM) > fluoxetine (3.61±0.12μM) > amitriptyline (4.62±0.13μM) > bupropion (4.95±0.26μM) > trazodone (8.39±0.19μM) 순이었다. (mean±SEM)
5. 단일 이온채널 기록법에 의해 TRPC6 전류활성을 측정할 수 있었으며, 항우울제는 직접 TRPC6 이온채널을 억제하였다.

이상의 결과들을 통해 항우울제는 농도-의존적으로 receptor-operated 이온채널로 제시되는 TRPC6의 활성을 직접 억제하는 것으로 제시된다.

참고 문헌

Akiskal HS, and McKinney, WT, Jr. Overview of recent research in depression. Integration of ten conceptual models into a comprehensive clinical frame. *Arch Gen Psychiatry* 1975;32:285-305.

Amsterdam J, Brunswick D, and Mendels J. The clinical application of tricyclic antidepressant pharmacokinetics and plasma levels. *Am J Psychiatry* 1980;137:653-662.

Aronson MD, Hafez H. A case of trazodone-induced ventricular tachycardia. *J Clin Psychiatry* 1986;47:388-389.

Authi KS. TRP channels in platelet function. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 425-443.

Beck AT. Depression: clinical, experimental, and theoretical aspects, 1967 (New York,, Hoeber Medical Division).

Biggs JT, Spiker DG, Petit JM, Ziegler VE. Tricyclic antidepressant overdose: incidence of symptoms. *JAMA* 1977;238:135-138.

Bosse GM, Spiller HA, Collins AM. A fatal case of venlafaxine overdose. *J Med Toxicol* 2008;4:18-20.

Boulay G, Zhu X, Peyton M, Jiang M, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein. *J Biol Chem* 1997;272:29672-29680.

Carl A, Lee HK, Sanders KM. Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am J Physiol* 1996;271:C9-34.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-524.

Dalton SO, Johansen C, Mellemkjaer L, Norgard B, Sorensen HT, Olsen JH. Use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of upper gastrointestinal tract bleeding: a population-based cohort study. *Arch Intern Med* 2003;163:59-64.

de Abajo FJ, Rodriguez LA, Montero D. Association between selective serotonin reuptake inhibitors and upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. *BMJ* 1999;319:1106-1109.

Delgado PL. How antidepressants help depression: Mechanisms of action and clinical response. *J Clin Psychiat* 2004;65:25-30.

Dietrich A, Kalwa H, Fuchs B, Grimminger F, Weissmann N, Gudermann T. In vivo TRPC functions in the cardiopulmonary vasculature. *Cell Calcium* 2007;42:233-244.

Dietrich A, Mederos YSM, Gollasch M, Gross V, Storch U, Dubrovska G,

Obst M, Yildirim E, Salanova B, Kalwa H, et al. Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice. *Mol Cell Biol* 2005;25:6980-6989.

El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua A, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, Patel G, Goulding D, Lupu F, Wojcikiewicz RJ, et al. Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. *Blood* 2000;95:3412-3422.

Estacion M, Sinkins WG, Jones SW, Applegate MA, Schilling WP. Human TRPC6 expressed in HEK 293 cells forms non-selective cation channels with limited Ca^{2+} permeability. *J Physiol* 2006;572:359-377.

Glassman AH, Bigger JT. Jr., Giardina EV, Kantor SJ, Perel JM, Davies M. Clinical characteristics of imipramine-induced orthostatic hypotension. *Lancet* 1979;1:468-472.

Glassman AH, Preud'homme XA. Review of the cardiovascular effects of heterocyclic antidepressants. *J Clin Psychiatry* 1993;54:16-22.

Gudermann T, Mederos y Schnitzler M, Dietrich A. Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? Sci STKE 2004;p35.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.

Hassock SR, Zhu MX, Trost C, Flockerzi V, Authi KS. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC6 forms the store-independent calcium entry channel. *Blood* 2002;100: 2801-2811.

Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca2+ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* 2003;22:776-785.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7461-7466.

Huang CL. The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1690-1699.

Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular $alpha_1$-adrenoceptor-activated Ca^{2+}-permeable cation channel. *Circ Res* 2001;88:325-332.

Janowsky D, Curtis G, Zisook S, Kuhn K, Resovsky K, Le Winter M. Trazodone-aggravated ventricular arrhythmias. *J Clin Psychopharmacol* 1983;3:372-376.

Jung S, Strotmann R, Schultz G, Plant TD. TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C347-359.

Kent JM. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet* 2000;355:911-918.

Kotlikoff MI, Herrera G, Nelson MT. Calcium permeant ion channels in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;134:147-199.

Kuriyama H, Kitamura K, Itoh T, Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 1998;78:811-920.

Li N, Wallen NH, Ladjevardi M, Hjemdahl P. Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997;8:517-523.

Meijer WE, Heerdink ER, Nolen WA, Herings RM, Leufkens HG, Egberts AC. Association of risk of abnormal bleeding with degree of serotonin reuptake inhibition by antidepressants. *Arch Intern Med* 2004;164:2367-2370.

Minke B. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 1977;3:59-64.

Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+}. *Pharmacol Rev* 1988;40:87-119.

Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 2002;108:595-598.

Montell C, Jones K, Hafen E, Rubin G. Rescue of the Drosophila

phototransduction mutation trp by germline transformation. *Science* 1985;230:1040-1043.

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, et al. Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca^{2+}-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 1999;274:27359-27370.

Owsianik G, D'Hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2006;156:61-90.

Park KS, Kong ID, Park KC, Lee JW. Fluoxetine inhibits L-type Ca2+ and transient outward K^+ currents in rat ventricular myocytes. *Yonsei Med J* 1999;40:144-151.

Reeve HL, Nelson DP, Archer SL, Weir EK. Effects of fluoxetine, phentermine, and venlafaxine on pulmonary arterial pressure and electrophysiology. *Am J Physiol* 1999;276:L213-219.

Rengasamy A, Soura S, Feinberg H. Platelet Ca^{2+} homeostasis: Na^+-Ca^{2+} exchange in plasma membrane vesicles. *Thromb Haemost* 1987;57:337-340.

Roberts DE, McNicol A, Bose R. Mechanism of collagen activation in human platelets. *J Biol Chem* 2004;279:19421-19430.

Roose SP, Glassman AH, Giardina EG, Walsh BT, Woodring S, Bigger JT. Tricyclic antidepressants in depressed patients with cardiac conduction disease. *Arch Gen Psychiatry* 1987;44:273-275.

Sadock BJ, Sadock VA. eds. Synopsis of Psychiatry, 9th edn Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P, Kaplan HI. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatry, 9th edn Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009.

Skop BP, Brown TM. Potential vascular and bleeding complications of treatment with selective serotonin reuptake inhibitors. Psychosomatics 1996;37:12-16.

Stahl SM. Essential psychopharmacology of depression and bipolar disorder, 2nd edn Cambridge, U.K. ; New York, Cambridge University Press, 2000.

Tang SW, Seeman P. Effect of antidepressant drugs on serotonergic and adrenergic receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1980;311:255-261.

Vitullo RN, Wharton JM, Allen NB, Pritchett EL. Trazodone-related exercise-induced nonsustained ventricular tachycardia. *Chest* 1990;98: 247-248.

Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res* 2002;90:248-250.

Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 1996;85:661-671.

ABSTRACT

Regulation of TRPC6 channels by antidepressants

Young-Hun Choi
Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jong-Whan Choi)

TRPC6 is a member of the canonical transient receptor potential (TRPC) subfamily, Ca^{2+}-permeable cation channels that are stimulated by activation of G protein-coupled receptors or receptor tyrosine kinases through PLC-dependent mechanism. It hasbeen proposed to play a critical role in VEGF-mediated angiogenesis, constriction of vascular smooth muscle cells and cardiac hypertrophy. It has been known that antidepressants possess potent antagonistic properties on a variety of ion channels in different tissues. In this study, we investigated the effects of antidepressants for human TRPC6 channels co-expressed with STIM1 (stromal interacton molecule 1) and M3 (muscarinic receptor type 3) in HEK 293 cells using the whole-cell and single-cell patch-clamp method. TRPC6 currents were induced by muscarinc stimulation or inclusion of GTPγγS into the pipette solution. Fluoxetine inhibited GTPγS-induced peak current on a concentration dependent manner under a holding potential of -100 mV, whereas it was not to affect on open

probability of TRPC6 by carbachol-induced M3 activation. Many antidepressants inhibited directly TRPC6 current, with an IC50 value (log M) of -4.99±0.03 for venlafaxine(SNRI), -4.94±0.02 for fluoxetine(SSRI), -4.84±0.02 for amitriptyline(TCA), -4.81±0.03 for bupropion(NDRI) and -4.58±0.01 for trazodone(SRI). Our data showed that a various type of antidepressants has direct inhibitory effect on TRPC6 channel.

Key words : TRPC6, HEK293 cell GTPγs, antidepressant, fluoxetine, venlafaxine, amitriptyline, bupropion, trazodone